

**Verwendung eines Gemisches für die Herstellung eines Mittels zur Behandlung von defektem oder degeneriertem Knorpel in vivo und bei der Herstellung von natürlichem Knorpelersatz in vitro.**

Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung eines Gemisches für die Herstellung eines Mittels zur Behandlung von defektem oder degeneriertem Knorpel in vivo gemäss dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1 sowie auf die Verwendung dieses Gemisches bei der Herstellung von natürlichem Knorpelersatz in vitro gemäss Anspruch 9.

Permanente Schmerzen, Unbeweglichkeit und eine Beeinträchtigung des Gelenkes sind typische Anzeichen für eine Verletzung des Knorpels durch einen Unfall oder Osteoarthrose. Der Erfolg von chirurgischen Eingriffen bei Gelenkverletzungen wie z.B. die Osteotomie, Verpflanzung des Perichondriums oder der Einsatz einer Arthroplastik ist beschränkt. In der Regel wird durch eine Operation nie die natürliche Hyalinstruktur eines gesunden Knorpels erreicht.

Es wird angestrebt für die Behandlung von Knorpeldefekten Gerüste aus Polymerwerkstoffen zu implantieren, welche mit Chondrozyten besiedelt werden. Sie dienen hierbei als Trägerwerkstoff für die Chondrozyten und sind als resorbierbarer oder nicht-resorbierbarer Werkstoff verfügbar. In den letzten Jahren wurden Gerüste aus natürlichen und synthetisch resorbierbaren Trägerwerkstoffen entwickelt und getestet. Dabei wurde festgestellt, dass diese in vitro gezüchteten knorpelähnlichen Konstruktionen weder die biochemischen noch die biomechanischen Eigenschaften von *in vivo* Geweben erreichen.

In der klinischen Behandlung von Knorpeldefekten kommen mehrere Methoden zur Anwendung. In der Vergangenheit wurde das beschädigte Knorpelgewebe vorwiegend mechanisch entfernt. Neue Behandlungsmethoden transplantieren Chondrozyten und Periost oder Perichondrium zur Schliessung der Läsion.

Die Methode der Ausfräsung wurde erstmals 1959 von Pridie beschrieben. Das Verfahren der abrasiven Entfernung wurde in den Achtzigerjahren entwickelt. Beide Methoden beruhen auf demselben Prinzip. Die defekten Knorpelstellen werden bis auf den blutenden Knochen abgetragen. Es wird soviel Knorpel entfernt, bis der Übergang vom Knochen zum Knorpel ausschliesslich von unbeschädigtem Knorpel gebildet wird. Die Heilung des Knorpels wird durch die reichhaltige Nährstoffversorgung der geöffneten Blutgefässe des Knochens gefördert. Zahlreiche Studien zeigen, dass das nachwachsende Gewebe überwiegend aus Faserknorpel besteht und nicht aus hyalinem Knorpel der eigentlich zu einer dauerhaften Regeneration notwendig wäre.

Andere Verfahren bedienen sich osteochondraler Transplantate. Diese Transplantate, entweder als Autograph oder Allograph, werden in den Knorpeldefekt eingesetzt und im subchondralen Knochen verankert. Im ersten Fall (Autograph), sind Organspender und Wirt ein und dieselbe Person, im zweiten Fall (Allograft) sind sie unterschiedlich, jedoch von der selben Spezies. Mit Hilfe eines Stanzwerkzeuges werden zylindrische Knorpelstifte zusammen mit dem subchondralen Knochen aus der Spenderregion entfernt und in der Defektzone mittels einer vorgefertigten Presspassung verankert. Je nach Grösse der Defektzone werden ein Stift oder mehrere Stifte (-> Mosaikplastik) eingesetzt, um geschädigte Oberfläche zu schliessen.

Bei der Transplantation von Chondrozyten werden Chondrozyten aus Knorpelregionen des Knies entfernt, die nicht so stark beansprucht werden. Die entnommenen Zellen werden innerhalb von 14 bis 21 Tagen in Nährlösung vermehrt. Nach der Kultivierung werden die Zellen in die Region des Defektes injiziert und mit einem Stück Periost oder Perichondrium abgedeckt. Nach 2 Jahren kann durch eine Biopsie gezeigt werden, dass sich hyaliner Knorpel gebildet hat. In einer Studie wurde das klinische Ergebnis von 14 aus 16 Patienten als gut bis sehr gut beschrieben. Eine Studie in Schweden mit 400 Patienten zeigte vergleichbare Ergebnisse.

Die Funktion von Gelenkknorpel besteht einerseits in der Aufnahme und Verteilung von Kräften, welche bei der Belastung des Gelenkes auftreten und andererseits in der Zurverfügungstellung einer schmierenden Oberfläche, welche den Abrieb und die Degradierung des Gelenkes verhindert. Die erste Funktion wird durch eine einzigartige Zusammensetzung und Struktur der extrazellulären Matrix sichergestellt, die zweite

Funktion hängt dagegen von einer funktionellen Interface Knorpel-Synovia ab. Gerade bei Patienten mit degenerativ veränderten oder anderweitig in Mitleidenschaft gezogenen Knorpelflächen, sind diese Funktionen gestört.

Hier will die Erfindung Abhilfe schaffen. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einerseits ein Mittel zur Behandlung von defektem oder degeneriertem Knorpel in vivo zu schaffen und andererseits eine verbesserte Herstellung von natürlichem Knorpelersatz in vitro, insbesondere für Knorpeldefekte im Gelenkbereich, zur Verfügung zu stellen.

Die Erfindung löst die gestellte Aufgabe mit einem Mittel, welches die Merkmale des Anspruchs 1 aufweist, sowie einer Verwendung dieses Mittels, welche die Merkmale des Anspruchs 9 aufweist.

Als Lubricin wird das schmierende Glycoprotein-1 (LGP-1) benannt, welches aus dem gleichen Gen hergestellt wird wie der Megakaryocyt-Stimulierungsfaktor (MSF) durch alternatives Splicing. Lubricin hat ein Molekulargewicht von ungefähr 230 kDa (gereinigte Form in der humanen Synovial-Flüssigkeit) und ist hochgradig glycosyliert.

Als Proteoglycan 4 (PRG4) wird das Oberflächenzonenprotein (SZP) benannt, welches durch alternatives Splicing aus dem MSF Gen gewonnen wird. Es hat ein Molekulargewicht von ungefähr 340 kDa (aus humanem Gelenkknorpel) und trägt mehrere Oligosaccharid-Reste sowie Glycosaminoglycan-Ketten. Es hat sich gezeigt, dass die Verwendung von SZP und ähnlicher Substanzen (Gruppe A) im erfindungsgemässen Gemisch nicht nur eine starke Schmierwirkung zeigt, sondern auch als chondroprotektives Molekül wirkt, welches einen Schutz für die tieferliegenden Knorpelzellen gewährt.

SZP wurde ursprünglich aus Kulturflüssigkeiten von Explantaten isoliert und gereinigt, welche aus der Oberflächenzone von bovinem Knorpel stammten. SZP kann durch Chondrozyten in der Oberflächenzone synthetisiert werden, jedoch nicht aus den mittleren und tieferen Zonen.

Die Hyaluronsäure besteht aus Glucuronsäure und Actetylglucosamin, die das Disaccharid Hyalubironsäure aufbauen. Hyaluronsäure bildet infolge ihrer fadenförmigen, unverzweigten Molekülstruktur hochvisköse Lösungen. Hyaluronsäure besitzt zwar keine direkten Schmiereigenschaften, doch ist sie wichtig für das rheologische Verhalten der Synovial-Flüssigkeit durch Einstellung eines geeigneten Viskositätsgrades, welcher ein Ausfliessen der Synovial-Flüssigkeit während der Belastungsphase des Gelenkes verhindert.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass eine Mischung von Lubricin (oder ähnlichen Substanzen gemäss Gruppe A) mit Hyaluronsäure (oder ähnlichen Substanzen gemäss Gruppe B) in einem geeigneten Lösungsmittel in synergistischer Weise die Wirkung beider Substanzen verstärkt.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen gekennzeichnet.

Die durch die Erfindung erreichten Vorteile sind im wesentlichen die folgenden:

- Bei Patienten mit Osteoarthrose kommt es durch eine verbesserte Schmierung zur Schmerzreduktion und zu einer Verzögerung oder gar Verhinderung einer weiteren Knorpeldegradation
- Bei Patienten mit Hemiarthroplastik lässt sich durch die verbesserte Schmierung eine Reduktion der Knorpeldegeneration und ein verminderter Abrieb des Kunstgelenkes erwarten. Dadurch steigt die Lebensdauer des Implantates und eine Revision kann verhindert oder verzögert werden.
- Bei Patienten mit Knorpeltrauma bzw. operativen Eingriffen werden durch die Schmierung die Scherkräfte an der (Schnitt)wunde reduziert, wodurch es zu einer besseren Heilung der beiden Gewebehälften kommt;
- Die Schmierung von Gelenken bei Osteoarthrose, Hemiprothesen, nach oestochondralem Transplantat und autologem Zelltransplantat (ACT) oder nach einer Meniskus-Operation.

Die verbesserte Schmierung wird sowohl beim natürlichen Gelenk (insbesondere in Fällen von Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis) als auch beim künstlichen Gelenk erreicht. Bei Hüft-Totalprothese wird die Schmierung zwischen dem Polyethylen der Acetabulum-Komponente und dem Metall des Hüftkopfes der Schaft-Komponente verbessert.

Bei einer besonderen Ausführungsform sind die verwendeten Phospholipide oberflächenaktiver Natur. Die dadurch resultierende Grenzflächenschmierung bewirkt eine weniger starke Knorpelschädigung im weiteren Verlauf.

Die zu verwendende Hyaluronsäure weist zweckmässigerweise ein Molekulargewicht von mindestens  $1 \times 10^6$  Da auf.

Vorteilhafterweise liegt das Gewichtsverhältnis A/B zwischen den Substanzen der Gruppe A [Lubricin, Proteoglycan 4 (PRG4) und Phospholipide (SAPL)] und der Gruppe B [Hyaluronsäure, Glycosaminoglycan und Derivate dieser Substanzen] im Bereich von 0,05 und 0,40, vorzugsweise im Bereich von 0,08 und 0,25.

Das zu verwendende Lösungsmittel ist vorteilhafterweise eine Ringer-Lösung, vorzugsweise eine physiologische Kochsalzlösung.

Die Konzentration der Substanzen der Gruppe A im Lösungsmittel liegt vorzugsweise im Bereich von 0,02 bis 0,05 Gew.-% und diejenige der Substanzen der Gruppe B im Bereich von 0,2 bis 0,4 Gew.-%.

Das Gemisch aus einer oder mehreren Substanzen der Gruppe

A) Lubricin, Proteoglycan 4 (PRG4) und Phospholipide (SAPL);

mit einer oder mehreren Substanzen der Gruppe

B) Hyaluronsäure, Glycosaminoglycan und Derivate dieser Substanzen;

aufgelöst in einem Lösungsmittel,

kann auch zur Herstellung von natürlichem Knorpelersatz in vitro verwendet werden.

Ein solches Gemisch kann auch für ein Verfahren zur Herstellung eines Knorpelersatzmaterial für Knorpeldefekte im Gelenkbereich verwendet werden, wobei

ein offenporiger, elastischer Zellträger-Körper in seinen Poren mit Chondrozyten besiedelt wird und dieses Gemisch in einem physiologisch akzeptablem Lösungsmittel aufgelöst mit den Chondrozyten in Kontakt gebracht wird.

Bei diesem Verfahren wird das Lösungsmittel vorzugsweise mit einer laminaren Strömung über den Zellträger-Körper bewegt.

Bei einer besonderen Ausführungsform dieses erfindungsgemässen Verfahrens wird mittels einer gelenkkugelähnlichen Vorrichtung gleichzeitig eine axiale und eine rotative Kraft auf den Zellträgerkörper aufgebracht. Vorzugsweise wird die Rotation der gelenkkugelähnlichen Vorrichtung um zwei orthogonal zueinander stehende Achsen durchgeführt. Der Vorteil dieser Massnahme liegt darin begründet, dass bei entsprechender Phasenverschiebung Bewegungstrajektorien eingestellt werden können, welche denjenigen humaner Gelenke hinsichtlich Distanz, Form und Geschwindigkeit nahekommen.

Die Erfindung und Weiterbildungen der Erfindung werden im folgenden anhand mehrerer Ausführungsbeispiele noch näher erläutert.

#### **Beispiel 1**

4 mg Lubricin und 40 mg Hyaluronsäure wurden in 20 ml physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung) aufgelöst. Während 10 Wochen wurde einmal pro Woche ein Volumen von 2 ml der solcherart erhaltenen Lösung einem Patienten mit Osteoarthritis in situ in das Kniegelenk injiziert. Vor der Injektion wurde das Gelenk aspiriert, um eine Verdünnung der injizierten Lösung zu verhindern.

Der damit behandelte Patient hatte weniger Schmerzen und eine bessere Beweglichkeit des Kniegelenkes. Eine weitere Spülung zu einem späteren Zeitpunkt zeigte eine deutliche Reduktion loser Knorpelteilchen im Aspirat.

#### **Beispiel 2**

4 mg Lubricin und 40 mg Glycosaminoglycan wurden in 20 ml physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung) aufgelöst. Während 10 Wochen wurde einmal pro Woche ein Volumen von 1 ml der solcherart erhaltenen Lösung einem Patienten mit Osteoarthritis in situ in das Hüftgelenk injiziert. Vor der Injektion wurde das Gelenk

aspiriert, um eine Verdünnung der injizierten Lösung zu verhindern. Der damit behandelte Patient hatte weniger Schmerzen und eine bessere Beweglichkeit des Hüftgelenkes.

### **Beispiel 3**

5 mg Lubricin und 40 mg Hyaluronsäure wurden in 20 ml physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung) aufgelöst. Während 5 Wochen wurde einmal pro Woche ein Volumen von 2 ml der solcherart erhaltenen Lösung einem Patienten mit rheumatoider Arthritis in situ in die Fingergelenke injiziert. Vor der Injektion wurden die Gelenke aspiriert, um eine Verdünnung der injizierten Lösung zu verhindern. Der damit behandelte Patient hatte weniger Schmerzen und eine bessere Funktion der Hand durch den gesteigerten Bewegungsumfang der Fingergelenke.

### **Beispiel 4**

Nach erfolgter osteochondrale Transplantation wurden einem Patienten eine Lösung mit 6 mg Lubricin und 45 mg Hyaluronsäure in die geschlossene Gelenkkapsel injiziert. Das Lösungsmittel bestand aus 25 ml physiologischer Kochsalzlösung (Ringerlösung), welchem 5% humanes Serum des gleichen Patienten beigemischt wurden. Die endoskopische Untersuchung nach erfolgter physiotherapeutischer Therapie des Gelenks zeigte eine verbesserte Heilung der Schnittflächen zwischen Wirt und Spendergewebe. Der Patient war schmerzfrei und konnte seinen gewohnten Tätigkeiten nachgehen.

### **Beispiel 5**

Chondrozyten wurden von der kein Gewicht tragenden Region der einen Defekt aufweisenden Oberfläche des Kniegelenkes isoliert und direkt in einen offenporigen, elastischen Zellträger-Körper eingepflanzt. Der Zellträger-Körper bestand aus einem zylindrischen, porösen, biodegradierbaren Polyurethan-Gerüst mit einer zum Defekt identischen Grösse von 8 mm x 4 mm. Die Zelldichte betrug  $25\text{-}30 \times 10^6$ . Der in seinen Poren mit Chondrozyten besiedelte Zellträger-Körper wurde in „Dulbecco's modified

Eagles medium" (DMEM) kultiviert, welchem 5 % humanes Serum (des gleichen Patienten), eine Anzahl nicht-essentieller Aminosäuren, nämlich:

L-Alanin (0.89 mg/L), L-Asparagin (1.32 mg/L), L-Asparginsäure (1.33 mg/L), L-Glutaminsäure (1.47 mg/L), Glycin (0.75 mg/L), L-Prolin (1.15 mg/L) und L-Serin (1.05 mg/L),

sowie 40 µg/ml L-Prolin beigegeben worden war.

Zwei Tage nach erfolgter Besiedelung wurden noch 50 µg/ml Ascorbinsäure hinzugefügt. Zusätzlich wurden noch unmittelbar vor Beginn der mechanischen Belastung 0.2 mg Lubricin und 2 mg Hyaluronan pro ml Medium hinzugefügt, von dem 3 ml benötigt wurden. Das Medium wurde täglich ausgewechselt. Nach 6-tägiger Zellkultur wurde der Zellträgerkörper wie nachstehend beschrieben einer mechanischen Belastung ausgesetzt.

Die mechanischer Belastung des Zellträgerkörper erfolgte in einem sogenannte Bioreaktor-System, bei welchem der Zellträgerkörper der Wirkung einer Kugel ausgesetzt wurde, so dass sowohl rotative als auch axiale Kräfte auf den Zellträgerkörper aufgebracht werden konnte. Zweimal pro Tage wurde eine einstündige mechanische Belastung dieser Art auf den Zellträgerkörper ausgeübt. In einer Versuchsreihe wurde diese Prozedur von 3 Tagen bis 28 Tagen durchgeführt.

Die erwähnte Zugabe von 0,2 mg Lubricin und 2 mg Hyaluronan resultierte in einer verbesserten Produktion von funktionalem knorpelähnlichem Gewebe, welches nach erfolgter Implantation in einen Knorpeldefekt eine verbesserte physiologische Wirkung zeigt und zu einer optimaleren Heilung des Knorpeldefektes führte.



Patentansprüche

1. Verwendung eines Gemisches aus einer oder mehreren Substanzen der Gruppe A) Lubricin, Proteoglycan 4 (PRG4) und Phospholipide (SAPL); mit einer oder mehreren Substanzen der Gruppe B) Hyaluronsäure, Glycosaminoglycan und Derivate dieser Substanzen; aufgelöst in einem Lösungsmittel, für die Herstellung eines Mittels zur Behandlung von defektem oder degeneriertem Knorpel in vivo.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Phospholipide oberflächenaktiver Natur sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Hyaluronsäure ein Molekulargewicht von mindestens  $1 \times 10^6$  Da aufweist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewichtsverhältnis A/B zwischen den Substanzen der Gruppe A und der Gruppe B im Bereich von 0,05 und 0,40 liegt.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewichtsverhältnis A/B zwischen den Substanzen der Gruppe A und der Gruppe B im Bereich 0,08 und 0,25 liegt.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel eine Ringer-Lösung, vorzugsweise eine physiologische Kochsalzlösung ist.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Substanzen der Gruppe A im Lösungsmittel im Bereich von 0,02 bis 0,05 Gew.-% liegt.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Substanzen der Gruppe B im Lösungsmittel im Bereich von 0,2 bis 0,4 Gew.-% liegt.
9. Verwendung eines Gemisches aus einer oder mehreren Substanzen der Gruppe  
A) Lubricin, Proteoglycan 4 (PRG4) und Phospholipide (SAPL);  
mit einer oder mehreren Substanzen der Gruppe  
B) Hyaluronsäure, Glycosaminoglycan und Derivate dieser Substanzen;  
aufgelöst in einem Lösungsmittel,  
bei der Herstellung von natürlichem Knorpelersatz in vitro.
10. Verfahren zur Herstellung eines Knorpelersatzmaterials für Knorpeldefekte im Gelenkbereich unter Verwendung eines Gemisches nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass  
ein offenporiger, elastischer Zellträger-Körper in seinen Poren mit Chondrozyten besiedelt wird; und  
das Gemisch nach Anspruch 9 in einem physiologisch akzeptablem Lösungsmittel aufgelöst mit den Chondrozyten in Kontakt gebracht wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel mit einer laminaren Strömung über den Zellträger-Körper bewegt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass mittels einer gelenkkugelähnlichen Vorrichtung gleichzeitig eine axiale und eine rotative Kraft auf den Zellträgerkörper aufgebracht wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Rotation der gelenkkugelähnlichen Vorrichtung um zwei orthogonal zueinander stehende Achsen vollführt wird.